

氏名	菅 幸生
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第718号
学位授与の日付	平成17年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	播種性血管内凝固症候群モデルにおける経時的病態変動および臓器障害発現機序の検討
論文審査委員(主査)	辻 彰(自然科学研究科・教授)
論文審査委員(副査)	山田 清文(自然科学研究科・教授), 宮本 謙一(医学部附属病院・教授), 清水 栄(自然科学研究科・助教授), 松下 良(自然科学研究科・助教授)

学位論文要旨

Abstract

Tissue factor (TF) and lipopolysaccharide (LPS) are frequently used to induce disseminated intravascular coagulation (DIC) in experimental animal models. Although the pathophysiology of DIC may differ depending on which agent is used for induction of the disease, previous studies on models of DIC have not distinguished which DIC-inducing agent was used. I evaluated the characteristics of TF-induced and LPS-induced DIC using two types of DIC models, with special reference to selected haemostatic parameters and pathological findings within kidney. The time course of the pathophysiology differed remarkably among the TF-induced and LPS-induced DIC models in rats.

I investigated the relationship between endothelin and pathophysiology of DIC, using two models of DIC (TF-induced and LPS-induced DIC). LPS-induced organ failure was significantly suppressed by co-administration of TAK-044 (an endothelin receptor antagonist), although no effect of TAK-044 was observed on the haemostatic parameters. The present results suggested that vasoconstriction, as well as depressed fibrinolysis, contributes to severe organ dysfunction in LPS-induced, but not in TF-induced DIC, and endothelin plays a role in the development of organ dysfunction in LPS-induced DIC model.

Sharp increases in D-dimer levels and minimal organ dysfunction were observed in a TF-induced DIC model. I attempted to clarify the role of fibrinolysis in TF-induced DIC model using tranexamic acid (TA), a known antifibrinolytic agent. TA almost completely suppressed the elevation in D-dimer levels normally observed following TF-induced DIC, and an increase in organ dysfunction and glomerular fibrin deposition, similar to that observed with LPS-induced DIC, was seen. It was suggested that enhanced fibrinolysis plays an important role in preventing the development of organ failure.

In conclusion, pathophysiology and drug effects differed remarkably between TF- and LPS-induced DIC models in rats. I recommend that they should be assessed carefully as distinct entities to determine implication of their experimental and clinical use.

要旨

播種性血管内凝固症候群(disseminated intravascular coagulation: DIC)は、敗血症や急性白血病などの基礎疾患の存在下に凝固機序の過剰な活性化が生じ、全身の主として細小血管内に微小血栓が多発

する重篤な病態である。進行した場合には微小血栓による微小循環障害のため多臓器不全 (multiple organ failure: MOF) をきたしたり、血栓の材料である血小板やフィブリノゲン (fibrinogen: Fbg) などの凝固因子の消費性低下 (消費性凝固障害) および二次的な線溶活性化に伴う止血血栓の溶解が原因となって出血傾向がみられる。

DIC の病態解析、治療法の改善を目的とした研究に際しては、しばしば動物 DIC モデルが使用される。動物 DIC モデルを作成する際、組織因子 (tissue factor: TF) または、lipopolysaccharide (LPS) が頻用されてきたが、薬効評価を行う際なども、両者の病態モデルは明確に区別されずに使用されてきたのが実状である。臨床でみられる DIC においては、極端な凝固活性化は共通してみられるものの、基礎疾患により DIC の臨床像は多様であり、凝固優位型 DIC と線溶優位型 DIC に分類され、DIC の病型に応じた治療が検討されるようになってきている。動物 DIC モデルにおいても用いる誘発物質により、DIC の病像が異なる可能性が考えられ、著者らは、TF 誘発 DIC モデルと LPS 誘発 DIC モデルは著しい凝固活性化はみられるという点では共通しているものの分子マーカーの変動、臓器障害の程度、フィブリン沈着には大きな差異がみられることを指摘してきた。本研究では、TF と LPS により誘発させた DIC 病態の違いを更に詳細に明らかにするため、凝血的マーカー、臓器障害、血管作動性物質、血尿出現頻度、死亡率の経時的な変動について検討を加えた。TF モデルと LPS モデルの特徴を比較すると、1) 血中トロンビン-アンチトロンビン複合体 (thrombin-anti thrombin complex: TAT) の上昇度や消費性凝固障害の程度より、両モデルは凝血的観点からはほぼ同程度の DIC モデルと考えられた。2) LPS モデルにおいては血中プラスミノゲンアクチベーターインヒビター (plasminogen activator inhibitor: PAI) 活性が上昇し、D-dimer の上昇は軽度に留まるなど、線溶活性化の抑制がみられたが、TF モデルにおいては血中 PAI 活性の上昇は軽度であり、線溶活性化のマーカーである D-dimer の著増がみられるなど、両モデルにおける血中 PAI 活性と D-dimer の変動は対照的であった。3) LPS モデルにおいては臓器障害のマーカーが著明に上昇し、臓器障害が高度であるのに対し、TF モデルにおいてはほとんど臓器障害がみられなかった。また、腎系球体におけるフィブリン沈着も LPS モデルにおいて高度であり、腎障害の差を裏付けているものと思われた。4) LPS モデルにおいては血尿が全くみられなかったのに対し、TF モデルにおいては高頻度に血尿がみられた。5) 血管作動性物質については、LPS モデルで NOX の中等度上昇、エンドセリンの著増がみられたが、TF モデルでは NOX が著増し、エンドセリンはわずかな上昇がみられたのみであった。用いる DIC 誘発物質により、DIC モデルの凝固線溶学的動態、臓器障害の程度、血管作動性物質の動態、死亡率、血尿の出現率が大きく異なることが明らかになり、LPS モデルは臨床の線溶優位型 DIC に、TF モデルは凝固優位型 DIC に類似した性格を有するモデルであると考えられた。

DIC の二大症状は臓器障害と出血症状である。出血症状は補充療法によりある程度コントロール可能であるが、臓器症状はしばしばコントロール困難である。特に、敗血症に合併した DIC においては MOF をきたしやすいことが知られており、その理由としては線溶活性化が軽度に留まるために微小血栓が溶解されにくく、微小循環障害が進行しやすいためと考えられてきた。ただし、十分な抗凝固療法を行っても、DIC の臓器症状はしばしば不可逆的であり、凝固活性化以外の要素も DIC の病態に深く関与しているのではないかと考えられる。エンドセリンはきわめて強力な血管収縮作用を有するペプチドであり、一部の DIC においては、エンドセリンにより重要臓器における微小循環障害が助長されるのではないかとする報告がみられる。また、DIC 患者を経時的に追跡した検討においても、臨床的に改善のみられた患者では血中エンドセリン濃度が低下し、悪化した患者では血中エンドセリン濃度が上昇するという報告もみられ、DIC の病態とエンドセリンの間には密接な関係があることが想定される。本研究では、DIC におけるエンドセリンの役割を明らかとするため、二種類の動物 DIC モデルに対してエンドセリン受容体拮抗薬である TAK-044 を

投与し、DIC 病態に対する影響を検討した。TF モデルに対しては、TAK-044 は凝血学的データおよび病理学的データのいずれに対しても何の影響を与えなかった。しかし、有意差はなかったものの、血中 D-dimer の低下傾向がみられた。一方、LPS モデルに対しては凝血学的マーカーに対する影響はほとんどみられなかったが、血中 D-dimer 値は有意に上昇した。また、LPS モデルにおける臓器障害は TAK-044 (10 mg/kg あるいは 50 mg/kg) 投与により改善され、腎糸球体におけるフィブリン沈着も TAK-044 投与で有意に抑制された。血中 D-dimer 値は、微小血栓の主成分であるフィブリンのプラスミンによる分解産物を反映しているため、D-dimer 値の上昇がみられたことは、抑制されていた線溶が活性化され、フィブリンの分解が促進したためではないかと考えられた。TAK-044 投与により、TF モデルにおいては線溶活性化の抑制傾向(D-dimer の低下傾向)がみられ、LPS モデルにおいては線溶活性化が有意に亢進しており、TF モデルと LPS モデルでは全く反対の作用を示した。エンドセリン受容体拮抗薬の投与により、LPS 誘発 DIC モデルにおける臓器障害の改善がみられたことは、臓器障害の進展にエンドセリンの関連が深いと考えられる敗血症に合併した DIC に対する新規治療の開発につながる可能性があることを示唆している。

線溶活性化が著しい急性前骨髄急性白血病(acute promyelocytic leukemia: APL)に合併した DIC(線溶優位型 DIC)において、微小血栓の溶解が亢進していることにも起因するのか、出血症状は著明であるが臓器症状は乏しいことが特徴である。本研究では線溶優位型 DIC において臓器障害がみられにくいことが線溶活性化に起因するものであるかどうかをより明確にするために、APL と類似した病態を有する TF 誘発 DIC モデルに抗線溶薬(トラネキサム酸)を投与し、同モデルにおける臓器症状やフィブリン沈着に対する影響を検討した。また、従来の動物 DIC モデルを用いた報告では臓器症状に対する検討に比較して、出血症状に対する検討はほとんどされていない。そこで、ラット DIC モデルにおける出血症状の出現機序を明らかとするため、抗凝固薬(低分子ヘパリン)、トラネキサム酸による影響を検討した。TF モデルに対してトラネキサム酸を投与すると、血小板数、フィブリノゲン、TAT に対する影響は軽度であったが、血中 D-dimer 値の上昇はほぼ完全に抑制されており、トラネキサム酸は十分な抗線溶効果を発揮しているものと考えられた。その結果として、TF モデルにおいて本来は軽度である腎糸球体フィブリン沈着は、明らかに高度となっている。腎障害のマーカーである Cr も特に 4 および 8 時間後において明らかに高値となっていることから、TF モデルにおいても線溶活性化を抑制することにより、LPS モデルにおいてみられるような微小血栓の多発、臓器障害(特に、腎障害)が観察されるようになるものと考えられた。言い換えれば、TF モデルにおいて臓器障害が軽度である理由として、線溶活性化が重要な意味を有しているものと考えられた。血中 D-dimer 値の上昇は、DIC におけるもっとも重要な検査所見であり、DIC の診断上も不可欠と信じられてきたが、トラネキサム酸を用いた検討の結果からも、凝固活性化が高度な状況下での線溶抑制に伴う血中 D-dimer の抑制(検査所見としては正常化したように見える)は、DIC の臓器障害の悪化と関連していることが判明した。この点、血中 D-dimer は必ずしも DIC の病態の程度を総合的に評価しているマーカーではないものと考えられ、DIC 診断上も注意すべき点と考えられた。

本研究において、動物 DIC モデルにおける出血症状としての血尿の出現率について検討したところ、LPS モデルにおいては全く血尿がみられなかったのに対し、TF モデルにおいては高頻度に血尿がみられるというきわめて対照的な結果が得られた。TF モデルにおける出血症状は、低分子ヘパリン、トラネキサム酸のいずれの薬物投与においても有意に抑制された。低分子ヘパリンの投与では、消費性凝固障害、臓器障害ともに改善しており、これが出血症状を抑制した理由と考えられた。一方、トラネキサム酸の投与では、線溶抑制が生じた結果、微小血栓が溶解されずに残存するようになり、重篤な臓器障害が出現するなど DIC 病態が増悪したにもかかわらず、出血症状は改善されており、線溶活性化の抑制が出血症状に対して改善効果をもたらしたものと考えられた。特にトラネキサム酸投与により消費性凝固障害は全く改

善していない(血小板数はむしろ低下)にもかかわらず、血尿が改善されたことについては、注目すべき所見と考えられた。これは、TF モデルにおける血尿(出血症状)は消費性凝固障害よりも線溶活性化が主因であることを示唆しているものと考えられた。

以上より、動物 DIC モデルは、用いる誘発物質によりその病態は大きく異なり、また、薬剤に対する反応も各 DIC モデルによって異なることが多く、本研究で明らかとなった知見は、今後の DIC 研究や治療において重要な示唆を与えるものとする。

学位論文審査結果の要旨

播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation : DIC) は、敗血症や急性白血病などの基礎疾患の存在下に凝固機序の過剰な活性化が生じ、全身の主として細小血管内に微小血栓が多発する重篤な病態である。進行した場合には多臓器不全をきたしたり、消費性凝固障害および二次的な線溶活性化により出血傾向がみられる。これらの病態は組織因子 (tissue factor:TF) や lipopolysaccharide(LPS) によって動物モデルとして作成が可能であるが、著者らは、TF は臨床の線溶優位型 DIC、LPS は凝固優位型 DIC に類似した病態を呈することを指摘してきた。そこで本研究は、TF と LPS によりラットに誘発させた DIC 病態について更に詳細に検討を加え、以下に示す新規な成果を得た。

1. 両 DIC モデルでは、凝固活性化が亢進したが、LPS 誘発 DIC モデルでは、持続的な線溶抑制が観察され、腎糸球体フィブリン沈着 (微小血栓形成) などの臓器不全が経時的に増悪して死亡率も上昇した。TF 誘発 DIC モデルにおいては、血尿が観察されるが、臓器障害は軽度で死亡率も低値であった。

2. TF 誘発 DIC モデルにおける血尿は、トラネキサム酸や低分子ヘパリンによって有意に抑制されたが、消費性凝固障害の改善は低分子ヘパリンのみでみられた。これらの結果は、TF 誘発 DIC モデルにおける出血症状は消費性凝固障害と高度な線溶活性化が合併して初めて出現する可能性を示唆している。

3. LPS 誘発 DIC モデルにおいては血中エンドセリン濃度が上昇し、TF 誘発 DIC モデルにおいては全く変化しなかった。そこで、LPS 誘発 DIC モデルに対してエンドセリン受容体拮抗薬 TAK-044 を投与したところ、DIC 症状が改善した。

以上の結果より、LPS 誘発 DIC モデルは、凝固優位型 DIC としての特徴が明確となったが、TAK-044 により臓器障害が改善したことから、その病態にはエンドセリンが関与していることを明らかにした。一方、TF 誘発 DIC モデルは、トラネキサム酸により臓器障害が増悪し、出血症状が改善したことから、臨床の線溶優位型 DIC としての特徴を示すことを明らかにした。かかる研究は、今後の DIC 病態の解明研究や治療法の開発を行う上での重要な知見を与えており、博士 (薬学) 論文に値すると評価された。